Abril 1909 Tomo I — n.° 1

Sobre a ultrafiltração. Pesquizas tendentes a obter a concentração do sôro antidifterico

pelos Drs.

G. Giemsa e A. Godoy

Ueber Filtration und Versuche, mit Hilfe derselben Diphtherieserum zu konzentrieren

von

G. Giemsa und A. Godoy

A filtração de coloides dissolvidos atravez de gelatina de que se ocuparam já Martin, Bechholds, Malfitano, e Duclaux, tem adquirido, especialmente depois dos interessantes trabalhos de Bechholds, extraordinaria importancia.

De notavel valor são as pesquizas de Bechholds, em que, com o aparelho por elle construido e chamado de ultrafiltração, mostrou pela primeira vez que se podia variar a permeabilidade do filtro com modificar a concentração da geléa, e que, por filtros de diferentes permeabilidades se podia em filtrações fracionadas separar uns dos outros coloides de diferentes tamanhos de particulas. A tão promissoras perspectivas, que para a bioquimica em geral abria este metodo de filtração, já Bechholds se referiu em seu trabalho.

Será talvez de interesse lembrar aqui que no dominio da microbiolojia, notadamente no estudo dos chamados ajentes ultraviziveis, a filtração pelos gelatino-coloides já se mostrou de vantajem. Assim poderam Prowazek e Giemsa demonstrar, que pela ultrafiltração de material nativo de *Hühnerpest,* o qual como se sabe é infeciozo, mesmo na diluição de 1 : 1000 milhões, é o virus retido pelo filtro de modo a se obter sempre um filtrado com-

Die Filtration gelöster Kolloide durch Gallerte, mit welcher sich zuerst Martin (1), Malfitano (3), Borrel (3), Manca (3) und Duclaux (3) beschäftigten, hat bekanntlich durch die interessanten Arbeiten Bechholds (2) ausserordentlich an Bedeutung gewonnen.

Von besonderer Wichtigkeit sind die Versuche Bechholds, in denen er mit Hilfe eines von ihm konstruierten sog. Ultrafiltrationsapparates als Erster nachweisen konnte, dass sich die Filterdichte durch Aenderung der Gallertkonzentration beliebig variiren lässt und dass sich durch verschieden dichte Filter Kolloide verschiedener Teilchengrösse durch fraktionierte Filtrationen voneinander trennen lassen. Auf die überaus mannigfachen Perspektiven, die uns diese Filtrationsmethode für die gesamte Biochemie etc. eröffnet, hat Bechhold bereits in seinen Arbeiten hingewiesen.

Es dürfte vielleicht von Interesse sein, an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Filtration durch Kolloidgallerte auf parasitologischem Gebiete, namentlich beim Studium sogenannter ultravisibiler Erreger, bereits Vorteilhaftes geleistet hat. So konnten Prowazek und Giemsa (4) zeigen, dass es bei der Ultrafiltration von frischem Hühnerpestmaterial, das bekanntlich noch in einer Verdünnung von 1 : 1000 Millionen infektiös ist, mit absoluter Sicherheit gelingt, das Virus im Filter zurückzuhal-

pletamente inocuo; pela filtração em vela Chamberland-Pasteur isto acontece raras vezes, e pelo uzo de filtros mais grosseiros nunca se dá. O mesmo tem lugar para o cauzador da variola descrito por Prowazek e Aragão.

Requerem-se as condições seguintes para demonstração em estado puro desses microorganismos: filtrar primeiramente atravez uma vela esteril de *largos póros*, porem verificada impermeavel para as bacterias (por ex. uma vela de porcelana comum de Berkefeld), separase assim as bacterias existentes, podendo-se, então, supor que no filtrado só se encontra o chamado germen ultravizivel em estado de pureza, com o qual se poderá, daí por deante, proceder de modos diversos. Por processo semelhante se conseguiu, como resalta no mesmo trabalho, izolar os ajentes da variola e da *Hühnerpest* até aí desconhecidos ou ainda não diagnosticados com segurança. Aquilo que resta na ultrafiltração sobre a camada superficial de um filtro de grandes poros coberto de agar, lavado com agua fiziologica de clorureto de sodio, com o fim de separar o mais possivel a parte seroza, é finalmente tornado por esse meio sucetivel de coloração, e a cor revela nitidamente como formas muito pequenas. Indicações exatas sobre a membrana de agar aí empregada — vela de Pukal coberta com agar a 3 % — funcionando por pressão reduzida, são encontradas nos orijinais referidos.

A operação com este filtro não é sómente muito mais comoda, mas oferece notaveis vantajens sobre o aparelho de Bechholds como pudemos verificar.

Podia ser que este metodo fosse tambem utilizavel em estudos soro-biolojicos, e então, na experiencia, se conseguisse, com o emprego de filtros de diferentes graus de permeabilidade, obter o enriquecimento dos anticorpos existentes no soro antidifterico, simultaneamente com a separação dos componentes do soro sem importancia para a sua ação curativa. Como vantajens de nosso metodo de filtração pelo vacuo podemos indicar as seguintes:

ten und stets ein vollkommen unschädliches steriles Filtrat zu erhalten, während dies bekanntlich bei der Filtration durch Chamberland-Pasteur-Kerzen nur selten, bei Anwendung noch gröberer Bakterienfilter nie gelingt. Dasselbe gilt für den von Prowazek und Aragão (5) beschriebenen Erreger der Variola. Hieraus sind aber auch folgende für die Reindarstellung dieser Mikroorganismen wichtigen Schlüsse zu ziehen: Filtriert man das in einer genügenden Menge physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmte Material zunächst durch ein steriles, *weitporiges*, aber bekannterweise für Bakterien dichtes Filter, z. B. durch eine gewöhnliche Berkefeld'sche Kieselgurkerze, siebt man auf diese Weise die Bakterien gewissermassen ab, so muss man annehmen, dass man es im Filtrat nunmehr mit einer Reinkultur der sogenannten ultravisibilen Erreger zu thun hat, mit der man dann nach den verschiedensten Richtungen hin weiter operieren kann. Auf ähnliche Weise gelang es denn auch, wie aus denselben Arbeiten hervorgeht, die bis dahin unbekannten, bezw. noch nicht mit genügender Sicherheit diagnostizierten Erreger der Hühnerpest und Variola zunächst zu isolieren, sie durch Ultrafiltration auf der obersten Schicht einer weitporigen Agargallerte zurückzuhalten, durch Auswaschen mit physiologischer Kochsalzlösung von den serösen Bestandteilen möglichst zu trennen, und sie schliesslich, nachdem sie so für die färberische Darstellung geeigneter gemacht worden waren, durch Tinktion als äusserst kleine Gebilde sehr schön zur Anschauung zu bringen. Genaue Angaben bezüglich der damals benutzten Gallertmembranen — mit 1 bezw. 3 %-igem Agar überschichtete Pukalkerzen etc. —, bei denen mit Minusdruck gearbeitet wurde, befinden sich in den betreffenden Originalien.

Da sich das Operieren mit diesen Filtern nicht nur sehr bequem gestaltete, sondern dem Arbeiten mit dem Bechhold'schen Apparat gegenüber manch andere bemerkenswerte Vorteile zu bieten schien, entschlossen wir uns, diese Methode auch serobiologischen Studien nutzbar zu machen und zwar zunächst zu versuchen, ob es gelänge, bei Anwendung ver-

1) Observámos já em pesquizas preliminares, que pelo emprego do nosso aparelho — ao menos no que se refere á filtração de soro de cavalo — não se dá separação ou gelatinização do coloide, como por exemplo, observou Bechholds na ultra-filtração de soro de coelho nem solidificação no sentido de Duclaux. Pelo nosso metodo de filtração, o soro conserva, mesmo quando pela ultrafiltração foi concentrado até a consistencia xaropóza, o estado de liquido homojeneo e o filtro possue, como resalta da aproximada igualdade do reziduo seco em cada uma das frações da filtração, do começo ao fim a mesma permeabilidade para os soroproteinas. Se esta observação rezulta unicamente do vazio regular obtido pela trompa de agua ou, mais provavelmente da diferença essencial da ação da pressão ou do vacuo, só outras pesquizas poderão decidir.
2) Nosso aparelho torna superfluo o emprego de um ajitador, porque os coloides concentrados em virtude de um maior pezo especifico decem da superficie da vela para o fundo e aí se reunem, emquanto que o filtro é sempre envolvido por soro diluido que se adiciona.
3) O trabalho pelo vacuo permite seguir exatamente com a vista todo o curso da filtração, quer no soro filtrado, quer no restante.
4) Nosso aparelho é extraordinariamente barato e facil para se preparar.

A camada de agar sobre a vela de Pukal obtem-se com facilidade; todo o aparelho não difere esencialmente do já descrito por Prowazek e Giemsa, e compreende-se sem dificuldade pelo dezenho junto. E' esterilizado no autoclave; depois de frio mergulha-se a vela 3—4 vezes em agar liquefeito e esfriado a 50°, depois, com o fim de solidificar o coloide, coloca-se a vela em um cristalizador esfriado por gelo e no fundo agua para que não seque a camada de agar. Com algum exercicio obtem-se facilmente por este modo uma ca-

schieden dichter Filter im Diphterieserum eine Anreicherung von Antikörpern zu erzielen unter gleichzeitiger Abscheidung der für die Heilwirkung irrelevanten Serumbestandteile. Die Vorteile unserer Vacuum-Filtrationsmethode glauben wir hauptsächlich in folgenden Punkten erblicken zu müssen.

1) Wie wir schon gelegentlich einiger Vorversuche beobachteten, findet bei dem Arbeiten mit unserem Apparat — wenigstens soweit es sich um die Filtration von Pferdeblutserum handelt — ein Abscheiden bezw. ein Gelatinieren des Kolloids, wie es z. B. Bechhold bei der Ultrafiltration von Kaninchenserum beobachtete, eine sog. Solidifikation im Sinne Duclaux's nicht statt. Bei unserer Filtration bewahrte das Serum, selbst wenn es bis zu Sirupdicke durch Ultrafiltration eingeengt war, stets seinen homogenen flüssigen Zustand und die Filter zeigten dementsprechend, wie aus den annähernd gleichbleibenden Trockenrückständen der einzelnen Filtratsfraktionen hervorgeht, am Anfang wie am Ende der Filtration ziemlich dieselbe Durchlässigkeit für die Serumproteine. Ob diese Beobachtung lediglich auf den mässigen, durch die Wasserstrahlluftpumpe erzielbaren Druck zurückzuführen ist, oder, was wahrscheinlicher ist, auf prinzipielle Unterschiede, die zwischen der Wirkung von Druck bezw. Minusdruck obwalten, muss späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.
2) Unser Apparat macht einen Rührer überflüssig, da das konzentrierte Kolloid des höheren spezifischen Gewichtes wegen am Kerzenrand zu Boden sinkt und sich dort ansammelt, während das Filter immer mit dem nachfliessenden dünneren Serum umspült wird.
3) Das Arbeiten im Vacuum gestattet es, den ganzen Verlauf des Filtrationsprozesses, sowohl was Filtrat, wie Rückstand anbelangt, mit dem Auge genau verfolgen zu können.
4) Unser Apparat ist ausserordentlich leicht und wohlfeil herzustellen.

mada homojenea de agar. A camada de agar comporta-se um pouco dezigualmente, segundo a sua espessura, não no que diz respeito ao tamanho dos seus póros, que é o que sómente tem importancia. Durante a formação da camada, a torneira *a* deve se conservar aberta para que o calor que transmite o agar á vela de Pukal não determine pressão alguma no aparelho e por conseguinte a formação de bolhas na camada de agar solidificado. Pequenas bolhas de ar que se formam sobre o agar, rezultantes de introdução muito

rapida do filtro no coloide, podem facilmente eliminar-se pela aproximação de um fio de platina incandecente do logar em que ellas se encontram, quer a massa esteja liquida, quer já solidificada. Para se obter filtrados estereis é necessario intercalar entre o tubo que tem a torneira *a* e o tubo aspirador uma pequena bola cheia de algodão antes de se fazer a esterilização no autoclave. No tubo *b* coloca-se um pedaço de tubo de borracha com o fim de evitar que seja perfurado o filtro na introdução do capilar. Em lugar do filtro de Pukal pode-se, naturalmente, empregar ou-

Das Ueberschichten der Pukalzellen mit Agar wurde folgendermassen bewerkstelligt: Der ganze Apparat, der in der Hauptsache dem bereits früher von Prowazek und Giemsa (4) beschriebenen gleicht und dessen Anordnung ohne weiteres aus der beigegebenen Zeichnung ersichtlich ist, wurde zunächst im Dampftopf sterilisiert, darauf abgekühlt und die Zelle etwa bis d abwechselnd 3—4 mal bald in die flüssige, auf 50° abgekühlte Agarlösung hineingetaucht, bald behufs Erstarrens des Kolloids in einen eisgekühlten Zylinder gebracht, dessen Boden mit Wasser bedeckt war, um das Eintrocknen der Agargallerte zu verhindern. Bei einiger Uebung lässt sich auf diese Weise leicht eine homogene Ueberschichtung erzielen. Die Gallerte fällt zwar bezüglich der Dicke der Schicht etwas ungleich aus, nicht jedoch, worauf es in erster Linie ankommt, bezüglich ihrer Porengrösse. Während des Ueberschichtens ist Hahn a zu öffnen, damit sich infolge der Wärme, die sich von der Agarlösung auf die Pukalkerze überträgt, kein Ueberdruck im Apparat und als Folge hiervon Blasen in der erstarrenden

tro como o de Berkefeld, Chamberland etc., assim tambem a forma pode ser outra qualquer, alem da reprezentada no dezenho, tal como a cilindrica. A preparação da camada de celoidina é feita do mesmo modo, somente, porem, é a propria filtração limitada em virtude da penetração de grande quantidade de agua nos póros do coloide solidificado que continha o meio dissolvente. Para a preparação da solução de agar uza-se somente agua distilada. Para o modo de se comportar durante a filtração não é indiferente empregar-se como suporte da camada de coloide que depois deve ser solidificada uma vela humida ou seca. No primeiro cazo, temos uma camada superficial; ao contrario, no segundo, em que uma camada se forma penetrando na vela, observa-se que a filtração se procede mais rapidamente não se dando a imbibição. Este fato é interessante não só teorica como praticamente. Uma camada melhor se obtem esfriando previamente a vela de Pukal em agua gelada antes de mergulhar no agar pouco quente. A gelatina, devido ao tempo para se solidificar, apropria-se pouco, ou mesmo nada, para o revestimento.

Diversas pesquizas preliminares feitas com celoidina, gelatina e agar nos mostraram que o ultimo é o que mais se apropria ao nosso fim; ao contrario da gelatina consegue-se facilmente que o agar se solidifique, mesmo quando a temperatura ambiente é alta; em contrapozição com a celoidina, no agar não é o liquido intermicelar facilmente volatil, de modo que com elle se pode obter um filtro esteril e de tamanho avaliavel de póros.

Para se fazer idéa da permeabilidade do material de filtro que uzámos, filtrámos soro de cavalo atravez de membranas de agar de diferentes grandezas de póros, assim como de celoidina, durante o tempo necessario á passajem de metade da quantidade primitiva atravez do filtro com a camada. A tabella I rezume os rezultados obtidos, e aí assinalámos os reziduos solidos na sua maioria constituidos por substancias albuminoides e o reziduo da incineração indicando os sáes inorganicos correspondentes ao soro filtrado e ao concentrado.

Agarschicht bilden. Kleine Luftbläschen, die mitunter infolge zu schnellen Eintauchens des Filters in den Agar auf der Gallerte entstehen, lassen sich leicht durch Annäherung eines glühenden Platindrahtes an die betreffenden Stellen der flüssigen oder in Erstarrung begriffenen Masse entfernen. Um sterile Filtrate zu erzielen, ist es notwendig, zwischen dem Rohr, an welchem Hahn a angebracht ist, und dem Saugschlauch eine mit Watte gefüllte Vorlage anzubringen, bevor die Sterilisation des ganzen Apparates im Dampftopf erfolgt. Am Rohr b ist ein Gummischlauch angebracht, der ein Durchstossen der Filterzelle beim Einfügen der Capillare verhindert. Anstatt der Pukalfilter kann man natürlich auch solche nach Berkefeld, Chamberland etc. benutzen, ebenso ist man durchaus nicht an die in der Zeichnung angegebene Form des Filters gebunden, sondern kann auch mit Zylindern u. dergl. arbeiten. Die Zelloidinüberschichtung geschah in ähnlicher Weise, nur wurde vor der eigentlichen Filtration das in den Poren des erstarrenden Kolloids befindliche Lösungsmittel durch Hindurchsaugen grösserer Wassermengen verdrängt. Zur Bereitung der Agarlösung diente ausschliesslich destilliertes Wasser. Für den zeitigen Verlauf der Filtration war es nicht ganz gleichgültig, ob man die Kolloidlösung, die später zur Filtergallerte erstarren sollte, auf einer feuchten oder trockenen Pukalkerze zum Gelatinieren gebracht hatte. In ersterem Falle, in welchem man es mit einem *Ueber-* anstatt mit einem *Durchschichten* der Kerze zu thun hat, beobachtet man, dass die Filtration stets schneller vonstatten geht als bei durchtränktem Pukal. Diese Tatsache ist ebenso theoretisch interessant wie praktisch bedeutsam.

Das *Ueber*schichten mit Agar gelingt am besten, wenn man die Pukalkerze vor dem Eintauchen in die mässig warme Agarlösung in Eiswasser kühlt. Gelatine eignet sich wegen ihres langsamen Erstarrens zum *Ueber*schichten wenig oder garnicht.

Verschiedene Vorversuche, die mit Cozelloidin-, Gelatine- und Agarfiltern angestellt wurden, liessen uns erkennen, dass sich letztere am besten für unsere Zwecke eigneten; im

Quadro I

Soro normal de cavalo

Filtração em	Pela filtração concentrou-se soro normal de		Reziduo seco de 10 cc. em gr.		Reziduo de incineração de 10 cc. em gr.		Côr
		Soro orijinal	0.924		0.055		amarelado
Agar 1 %	200 cc. á 100 cc.	Soro concentrado	1.220		0.072		amarelo
		Filtrado $^3/_{10}$		0.641		0.040	amarelado
		Filtrado $^8/_{10}$		0.639		0.039	amarelado
Agar 3 %	200 cc. á 100 cc.	Soro concentrado	1.541		0.078		amarelo escuro
		Filtrado $^3/_{10}$		0.290		0.036	quazi incolor
		Filtrado $^8/_{10}$		0.272		0.035	quazi incolor
Celoidina	200 cc. á 100 cc.	Soro concentrado	1.602		0.070		amarelo escuro
		Filtrado $^3/_{10}$		0.242		0.046	incolor
		Filtrado $^8/_{10}$		0.240		0.044	incolor

Quadro II

Soro antidifterico

Filtração em	Pela filtração concentrou-se		Reziduo seco de 10 cc. em gr.		Reziduo de incineração de 10 cc. em gr.		Unidades imunizantes	Côr
		Soro orijinal	0.975		0.058		150-200	amarelado
Agar 1 %	300 cc. á 60 cc.	Soro concentrado	2.120		0.099		200-300	amarelo
		Soro filtrado		0.670		0.042	40-80	amarelado
Agar 3 %	300 cc. á 100 cc.	Soro concentrado	2.340		0.104		400-500	amarelo escuro
		Soro filtrado		0.278		0.035	menos de 10	quazi incolor

Tabelle I

Normalpferdeblutserum

Filtration durch:	Es wurden vom Normalserum durch Filtration eingeengt		Trockenrückstand aus 10 cc. in g.		Glührückstand aus 10 cc. in g.		Farbe
		Originalserum	0.924		0.055		gelblich
Agar 1 %	200 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum	1.220		0.072		gelb
		Filtrat $^3/_{10}$		0.641		0.040	gelblich
		Filtrat $^8/_{10}$		0.639		0.039	gelblich
Agar 3 %	200 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum	1.541		0.078		tiefgelb
		Filtrat $^3/_{10}$		0.290		0.036	fast farblos
		Filtrat $^8/_{10}$		0.272		0.035	fast farblos
Zelloidin	200 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum	1.602		0.070		tiefgelb
		Filtrat $^3/_{10}$		0.242		0.046	farbloss
		Filtrat $^8/_{10}$		0.240		0.044	farbloss

Tabelle II

Diphtherieserum

Filtration durch:	Es wurden durch Filtration eingeengt		Trockenrückstand aus 10 cc. in g.		Glührückstand aus 10 cc. in g.		Immunitäts-einheiten	Farbe
		Originalserum	0.975		0.058		150-200	gelblich
Agar 1 %	300 cc. auf 60 cc.	Concentr. Serum	2.120		0.099		200-300	gelb
		Filtrate (gemischt)		0.670		0.042	40-80	gelblich
Agar 3 %	300 cc. auf 100 cc.	Concentr. Serum	2.340		0.104		400-500	tiefgelb
		Filtrate (gemischt)		0.278		0.035	unter 10	fast farblos

O desecamento foi feito no vacuo sobre acido sulfurico e a incineração ao vermelho rubro e em todos os cazos até pezo constante. Debaixo da rubrica 3 do quadro encontramos a dezignação $^{3}/_{10}$ e $^{8}/_{10}$ que se deve entender como a terceira, ou oitava fração de 10 cc do filtrado. O resto do filtrado não foi minuciozamente pesquizado.

Os valores contidos no quadro mostram claramente que possuimos no agar um material de filtro apropriado para demonstrar com evidencia o fenomeno Bechholds. Aí vemos que, o agar a 1 °/₀ é mais permeavel para os coloides do soro que o agar a 3 °/₀; que o agar a 3 °/₀ não permite a passajem da materia córante do soro o que não fazem os póros do agar a 1 °/₀. Um filtro de celoidina mostra-se ainda menos permeavel para a materia córante e para os albuminoides que uma membrana de agar a 3 °/₀.

De mais interesse são os rezultados da avaliação do reziduo de incineração. Indicam que os valores obtidos no filtrado são notavelmente menores que os referentes ao soro concentrado ou ao orijinal.

Compreende-se por si, que a só avaliação do pezo não seja suficiente para responder si se dá aqui como fato predominante a adsorção do clorureto de sodio aos coloides do soro concentrado ou se os valores a mais se referem simplesmente ás substancias inorganicas (fosforo, calcio, etc.) que estando ligadas aos albuminoides do soro creceriam naturalmente á medida que o soro se concentrasse, e que, portanto, deveriam ser calculados separadamente. A rezolução desta questão será mais tarde obtida por meio de pesquizas especiais neste sentido e no que se refere em particular á dozagem quantitativa exata dos sais inorganicos no filtrado e no soro concentrado, notadamente no que diz respeito ao clorureto de sodio.

A filtração do soro antidifterico foi feita de modo semelhante ao do soro normal, sendo porém o aparelho protejido da luz. Servimo-nos aqui tambem do filtro com camada superficial. A compozição do soro orijinal, do soro concentrado, e do ultrafiltrado

Gegensatz zu Gelatine liess sich der Agar bei der hier herrschenden hohen Lufttemperatur leichter zum Erstarren bringen, im Gegensatz zum Zelloidin besteht bei ihm die intermicellare Flüssigkeit nicht aus einem leicht flüchtigen Medium, sodass bei ihm auf eine stabilere, bei wiederholter Filterbereitung immer wieder leicht herzustellende Porengrösse gerechnet werden kann.

Um uns von der Durchlässigkeit des zu benutzenden Filtermaterials ein Bild machen zu können, wurde zunächst normales Pferdeblutserum durch Agarmembranen verschiedener Porengrösse, ferner durch Zelloidin filtriert und zwar solange, bis die Hälfte des ursprünglichen Serumvolumens durch das «überschichtete» Filter gegangen war. Beistehende Tabelle I giebt über die hierbei erzielten Resultate Aufschluss und zwar die dort eingezeichneten Trockenrückstände über den Gehalt der Filtrate und der Konzentrationssera am festen, zum grössten Teil aus Albumin bestehenden Substanzen, die Glührückstände über den an anorganischen Salzen. Das Trocknen wurde im Vacuum über Schwefelsäure, das Glühen bei starker Rotglut vorgenommen und wurde in allen Fällen solange fortgesetzt, bis Gewichtskonstanz erreicht war. Unter den in Rubrik 3 der Tabelle bei den Filtraten stehenden Bezeichnungen $^{3}/_{10}$ und $^{8}/_{10}$ sind die an dritter bezw. an achter Stelle übergegangenen Fraktionen von je 10 ccm. zu verstehen. Das übrige Filtrat wurde nicht näher untersucht.

Die in der Tabelle enthaltenen Werte zeigen uns zunächst, dass wir in dem Agar ein Filtermaterial besitzen, das geeignet ist, das Bechhold'sche Phänomen recht gut zur Veranschaulichung zu bringen. So sehen wir, dass 1 °/₀iger Agar durchlässiger für die Serumkolloide ist wie 3 °/₀iger, dass ferner die Poren des 3 °/₀igen Agars dem Serumfarbstoff kaum noch den Durchtritt gestatten, während es die des 1°/₀igen noch thun. Ein Zelloidinfilter wies für Farbstoff und Eiweisskörper noch eine etwas geringere Durchlässigkeit als die 3 °/₀ige Agarmembran auf.

Von weiterem Interesse sind die Ergebnisse der Glührückstandsbestimmung. Sie zeigen, dass die bei den Filtraten erhaltenen

em substancias rezistentes á desecação e ao vermelho rubro (reziduo seco e de incineração), assim como o numero de unidades imunizantes se encontram no quadro II.

Os dados que aí se acham provam que possuimos na ultrafiltração um meio de elevar até trez vezes o valor antitoxico de um soro, evitando o emprego de temperatura de certo modo elevada ou de ajentes quimicos. Infelizmente é ella inutil para a soro-terapeutica, pois com o crecer de unidades imunizantes aumenta proporcionalmente a quantidade de materias albuminoides no soro enriquecido, sendo que, apezar de se conservar o soro completamente claro, elle se torna de consistencia xaropoza, de modo a ser pouco proprio para injeções. Além disso, como mostra o quadro, uma separação de albuminoides por meio de uma membrana de agar mais permeavel é acompanhada de perda aproximadamente equivalente de antitoxina. E' de notar que na filtração de soro antidifterico não se dá a minima *adsorção* dos anticorpos ao material do filtro, quando se compara o numero total de unidades imunizantes contidas no soro primitivo com as que existem no soro concentrado e no filtrado, levando em conta os respetivos volumes, se verifica que a perda de antitoxina é minima.

A questão está limitada a saber si se póde progredir nesse sentido ou não. Nosso parecer seria precoce, dado o numero pequeno de experiencias, e as pesquizas devem ser refeitas com outra orientação por ver si se obterão indicações outras. Porém hoje já podemos dizer que a ultrafiltração só terá evidente importancia para a pratica soroterapica quando se conseguir por meio d'ella separar as materias albuminoides ou, ao menos, a sua maior parte dos anticorpos. Esta idéa será realizada no dia em que se descobrir um material de filtro, que se caraterize, de um lado, por uma capacidade de adsorção para os anticorpos e de outro pela sua solubilidade em temperatura não nociva ao imunicorpo. Com o fim de realizar este pensamento procurámos uzar a gelatina não insolubilizada para material de filtro. Não foram porém as pesquizas conti-

Werte wesentlich geringer sind als die bei dem eingeengten bezw. Originalserum erzielten.

Es leuchtet ohne weiteres ein, dass die Gewichtsfeststellung an und für sich nicht genügt, um die ebenso theoretisch wie praktisch interessante Frage beantworten zu können, ob dieser beim konzentrierten Serum erhaltene Mehrbetrag lediglich auf Rechnung der an das Eiweiss chemisch gebundenen anorganischen Substanzen (Phosphor, Calcium etc.) zu setzen ist, die ja naturgemäss mit der Konzentration des Serums wachsen müssen, oder ob hier auch die Adsorption des Chlornatriums an das eingeengte Serumkolloid eine wesentliche Rolle spielt. Die Beantwortung dieser Frage muss demgemäss späteren, speziell nach dieser Richtung hin vorzunehmenden Untersuchungen vorbehalten bleiben, bei denen es namentlich auf genaue quantitative Bestimmung der anorganischen Salze im Filtrat und Konzentrationsflüssigkeit, insbesondere des Chlornatriums ankommen wird.

Die Filtration des *Diphtherieserums* wurde in derselben Weise wie die des Normalserums bewerkstelligt, nur schützten wir den Apparat vor Tageslicht. Auch hier bedienten wir uns der «überschichteten» Filter. Der Gehalt des Originalserums, des Konzentrationsserums und des Ultrafiltrates an festen bezw. hitzebeständigen Substanzen (Trocken- und Glührückstand) sowie an Immunitätseinheiten findet sich in Tabelle II.

Die dort niedergelegten Daten beweisen, dass wir in der Ultrafiltration ein Mittel besitzen, um den Antitoxingehalt eines Serums bei Vermeidung höherer Wärmegrade und chemischer Agentien bis auf etwa das dreifache zu erhöhen. Leider ist für die serotherapeutische Praxis hierdurch vorläufig noch wenig gewonnen, denn mit dem Wachsen der Immunitätseinheiten nimmt gleichzeitig auch der Eiweissgehalt zu und die Flüssigkeit erreicht schliesslich hierdurch, wenn auch unter Beibehaltung völliger Klarheit, eine derartig stark visköse sirupartige Konsistenz, dass sie für Injektionszwecke ungeeignet wird. Andererseits ist, wie ein Blick auf die Tabelle lehrt, ein bei der Filtration durch dünnporigere Agargallerte erreichbares Eliminieren von Ei-

nuadas, devido á alta temperatura ambiente que impedia se evitasse a fluidificação da membrana de gelatina durante a experiencia. As pesquizas serão agora retomadas e praticadas tambem com outras materias filtrantes.

Literatura

1) MARTIN. Journal of Physiol. Bd. XX, S. 364.

2) H. BECHHOLD. *Die Gallertfiltration.* Kolloid-Zeitschrift, 1907, Bd. 2, S. 3 und 33.

— *Kolloidstudien mit der Filtrationsmethode.* Zeitschr. f. physikal. Chemie. 1907, Bd. 60, S. 259 und 276.

— *Ultrafiltration.* Biochem. Zeitschrift, 1907, S. 379.

3) J. DUCLAUX. *Die Filtration kolloider Lösungen.* Kolloid-Zeitschrift, 1908, Bd. 3, S. 126. (Zugleich enthaltend Literaturangaben über die im Jahre 1904 und später erschienenen Arbeiten von Borrel, Manca und Malfitano).

4) G. GIEMSA und VON PROWAZEK. *Weitere Untersuchungen über sog. ultramikroskopische Infektionserreger. Zur Filtration des Hühnerpestvirus,* Münch. med. Wochenschrift, 1908, Nr. 29.

5) S. v. PROWAZEK und H. DE BEAUREPAIRE ARAGÃO. *Untersuchungen über die Variola.* Münch. med. Wochenschr., 1908, Nr. 44, S. 2265.

---

weiss auch mit einem Verlust einer annähernd äquivalenten Menge von Antitoxin verbunden. Bemerkenswert ist, dass bei der Filtration des Diphtherieserums eine nennenswerte *Adsorption* der Antikörper durch das Filtermaterial nicht stattfindet, denn vergleicht man die im ursprünglichen unfiltrierten Serum enthaltenen Immunitätseinheiten mit dem der Konzentrationssera bezw. Filtrate unter Berücksichtigung der betreffenden Volumina, so findet man, dass der Verlust an Antikörpern nur ein minimaler ist.

Es drängt sich nun die Frage auf, ob uns die Ultrafiltration überhaupt auf diesem Wege weiterbringen wird. Unserer Ansicht nach wäre es verfrüht, sie auf Grund dieser wenigen Versuche beantworten zu wollen, vielmehr müssen erneute, von anderen Gesichtspunkten ausgehende Experimente weiteres lehren. Soviel aber lässt sich heute schon sagen: von einschneidender Bedeutung für die serotherapeutische Praxis dürfte die Ultrafiltration erst dann werden, wenn es durch sie gelingt, das für die Immunisierung nicht in Betracht kommende Serumeiweiss oder wenigstens den grössten Teil desselben, von den Antikörpern zu trennen. Diese Idee liesse sich vielleicht durch Ausfindigmachen eines Filtermaterials verwirklichen, welches sich einerseits durch grosse Adsorptionsfähigkeit für die Antikörper auszeichnet, andererseits die Eigenschaft besitzt, später wieder bei einer mässigen, die Immunkörper nicht schädigenden Temperatur in Lösung gebracht werden zu können. Von diesem Gedanken ausgehend, versuchten wir zunächst ungehärtete Gelatine als Filtrirmaterial zu verwenden. Leider aber mussten wir die begonnenen Versuche vorläufig wieder abbrechen, da es unmöglich war, bei der z. Zt. hier herrschenden hohen Temperatur die Gelatinemembran während der ganzen Dauer eines Filtrierprozesses vor Verflüssigung zu schützen. Die Versuche sollen jedoch später wieder aufgenommen und auch auf anderes Filtermaterial ausgedehnt werden.